Respuesta de la lisozima al daño e inoculación bacteriana en larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Medina Pereyra, Pilar; Castro, J. Felipe; Pérez, M. Eugenia
Instituto de Fisiología Animal, Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, (4000) Tucumán, Argentina.
Autor de correspondencia: felipecastrobiologo@gmail.com

➤ **Resumen** — La lisozima es un agente antibacteriano y uno de los componentes principales de la respuesta inmune humoral en insectos. Se determinó el efecto de la injuria tegumentaria y de la inoculación de bacterias sobre la expresión y actividad de lisozima en hemolinfa de larvas de *Spodoptera frugiperda*. Se estudiaron tres grupos de larvas. A un primer grupo se le practicó una punción a modo de injuria (1). A un segundo grupo se le practicó la misma injuria pero con la inoculación de *Micrococcus luteus* (2). El tercer grupo no fue injuriado ni inoculado (3). Se determinó la actividad de lisozima y el perfil proteico en hemolinfa. No se encontraron diferencias significativas de la actividad de lisozima entre los grupos 1 y 3. En cambio, en el grupo 2 la actividad fue significativamente mayor, el triple comparado con los otros grupos. La electroforesis mostró para el grupo 1 y 2 un mayor número de bandas proteicas con respecto al grupo 3, pero en el grupo 2 la intensidad de estas bandas fue menor que en el grupo 1, excepto para la banda correspondiente a la lisozima. Se plantea la ocurrencia de una nueva síntesis de proteínas involucradas en el sistema de defensa o un aumento de la síntesis de las mismas, entre ellas la lisozima, cuando se produce injuria con inoculación.
Palabras clave: lisozima; *Spodoptera frugiperda*; respuesta inmune; inoculación baceriana.

➤ **Abstract** — "Lysozyme response to wounding and bacterial inoculation in larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)". Lysozyme is an antibacterial agent and one of the main components of insects´ humoral immune response. The effect of tegumentary injury and bacterial inoculation on the expression and activity of lysozyme in *Spodoptera frugiperda* hemolymph was determined. Three groups of larvae were studied. A punction injury was performed on the first group (1). The same was done to a second group adding inoculation with *Micrococcus luteus* (2). A third group was neither injured nor inoculated (3). Lysozyme activity and a protein profile were determined in hemolymph. No significant differences were found in lysozyme activity between groups 1 and 3. However, in group 2 activity was significantly greater, three times more compared to the other groups. Electrophoresis showed a greater number of protein bands for groups 1 and 2 compared to group 3, but in group 2 the intensity of these bands was lower than in group 1, except for the lysozyme band. The occurrence of new protein synthesis involved in the defense system or an increased synthesis thereof, including lysozyme, would appear when injury plus inoculation occurred.
Keywords: Immune response; lysozyme; *Spodoptera frugiperda*; bacterial inoculation.

INTRODUCCIÓN

Los insectos, organismos que han evolucionado exitosamente, están expuestos continuamente a microorganismos potencialmente patógenos y son capaces de reaccionar contra estos invasores con una respuesta inmune eficiente (Gillespie *et al*., 1997). En los últimos años, el sistema inmune innato de insectos, ha sido ampliamente estudiado, con especial énfasis en aquellos que constituyen plagas para la agricultura (Narayanan, 2004; Bulmer *et al*., 2009; Rao *et al*., 2010).

La lisozima (Lz), enzima que se encuentra en numerosos organismos, ha sido reportada y estudiada en insectos de diferentes órdenes por ser uno de los componentes

Recibido: 06/07/15 – Aceptado: 25/09/15

principales de la respuesta inmune humoral. Conocida por ser un agente antibacteriano natural, cataliza la hidrólisis de enlaces glicosídicos β (1-4) entre N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, mucopolisacáridos presentes en la pared celular bacteriana, lo cual, bajo determinadas condiciones, ocasiona la lisis de la mayoría de las bacterias Gram positivas y varias Gram negativas. La muerte bacteriana puede también ocurrir sin lisis (Düring *et al.*, 1999; Ibrahim *et al.*, 2001; Markart *et al.*, 2004), por una desestabilización de la membrana ocasionada por esta proteína, lo cual también ha sido observado en insectos (Gandhe *et al.*, 2007). Investigaciones en *Spodoptera frugiperda* Smith, una especie de amplia distribución Neotropical en el continente americano, de importancia agrícola y considerada plaga clave del maíz en el norte argentino (Willink *et al.*, 1991), permitieron la caracterización de esta proteína y descripción de su actividad en hemolinfa de larvas (Chapelle *et al.*, 2009, Medina Pereyra *et al.*, 2012).

Una manera de medir la actividad de lisozima es usando como sustrato una suspensión de *Micrococcus luteus* en buffer HEPES. La disminución de la densidad óptica demuestra la actividad de la lisozima contra las bacterias (Castro *et al.*, 2009). Mediciones de la actividad de lisozima a partir de los análisis espectrofotométricos, se utilizan en insectos como estimativo de la resistencia a enfermedades (Adamo, 2004), por lo que el registro de estos péptidos antimicrobianos representa un aporte de importancia en el conocimiento de la respuesta inmune de los insectos.

La utilización de herramientas proteómicas, como el caso de SDS-PAGE, es esencial para el estudio de sistemas biológicos en insectos. Esta metodología permite conocer qué tipos de proteínas se expresan, e identificar aquellos componentes proteómicos que sufren modificaciones en el nivel de expresión, como resultado de alteraciones fisiopatológicas, o debido a cambios en el medioambiente (Scherfer *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2010).

Al mismo tiempo, todas aquellas nuevas investigaciones acerca del manejo de insectos, sumado al conocimiento sobre las defensas antimicrobianas de *S. frugiperda* contribuirían al mejoramiento del control biológico de esta plaga de gran impacto económico.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la injuria tegumentaria y de la inoculación de bacterias sobre la expresión y actividad de lisozima en hemolinfa de larvas de *S. frugiperda*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Injuria e inoculación con bacterias a larvas de *Spodoptera frugiperda*

Se utilizaron tres grupos de diez larvas de *S. frugiperda* del último estadio larval, previamente alimentadas *ad libitum* con dieta artificial (Osores *et al.*, 1982) y mantenidas a 28±2 °C con un fotoperíodo de 14:10 (luz/oscuridad). A un primer grupo experimental se le practicó una punción a modo de injuria con una micropipeta de vidrio (Hamilton), en la zona media ventral de la larva, pero sin la inoculación de bacterias. A un segundo grupo se le practicó la injuria correspondiente (de la misma manera que en el caso anterior) para la administración de 10μl de *Micrococcus luteus* (Sigma, MO, USA) a una densidad óptica de 0.800 en buffer HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetan sulfónico). Un tercer grupo de larvas, que sirvió de control, no fue injuriado ni inoculado con bacterias.

Pasadas las 24 horas de estos procedimientos, se realizó la extracción de hemolinfa mediante un corte en una pseudopata abdominal de la larva. En forma previa a la colecta de hemolinfa, los insectos fueron enfriados a 4°C durante 45 minutos, para lograr sedación, y su superficie esterilizada con una solución de etanol al 70% (v/v). La hemolinfa fue colectada con una micropipeta de vidrio e inmediatamente transferida a un tubo Eppendorf estéril conteniendo feniltiourea de manera tal de obtener una concentración al 50% para evitar la coagulación y prevenir la melanización por efecto de la fenoloxidasa. Las muestras colectadas se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Determinación de la actividad de lisozima

Se agregó 100 μl de hemolinfa al 15% a una cuba de cristal orgánico conteniendo 2 ml de una suspensión de *M. luteus*. Dicha suspensión se realizó con buffer HEPES 50 mM a una densidad óptica de 0,600. Se tomaron lecturas de la reacción enzimática cada 15 segundos hasta llegar a los 3 minutos con un espectrofotómetro Zeltec ZL-5100, a una longitud de onda de 540 nanómetros. Se aplicó un Análisis de la Varianza seguido de un Test de Tukey usando el programa Infostat.

SDS-PAGE

Se analizó el perfil proteico de la hemolinfa de *S. frugiperda* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) (Harris y Angal, 1989) y en ausencia de agentes reductores, con la finalidad de verificar la presencia de lisozima en las diferentes muestras.

Las muestras se prepararon de la siguiente manera: Se integró un pool por cada uno de los tres grupos conteniendo 10 μl de cada muestra individual, y a partir de cada pool se prepararon las muestras a sembrar diluidas en la mezcla solubilizadora (50 Mm Tris-base, 2 % SDS, 20 % glicerol, y 0,002 % de azul de bromofenol). En cada pocillo del gel de poliacrilamida se sembraron 36,9 mg/ml de proteínas.

Como marcador de la enzima (control de peso molecular) se usó lisozima de clara de huevo (Sigma), en una concentración de 2 y 4 mg/ml respectivamente.

Las electroforesis (cuatro replicas para cada uno de los grupos en estudio) se realizaron al 15 %, a una temperatura de 4 ºC y 120 V de voltaje constante hasta que el frente de corrida (azul de bromofenol) llegó al extremo inferior del gel. Luego de las corridas electroforéticas, los geles fueron teñidos con Coomasie Brillant Blue R 250 (Sigma) para la visualización de las bandas de proteínas. Los geles fueron fotografiados (Nikon, Jp) y las imágenes digitalizadas fueron procesadas y analizadas usando el software Image J.

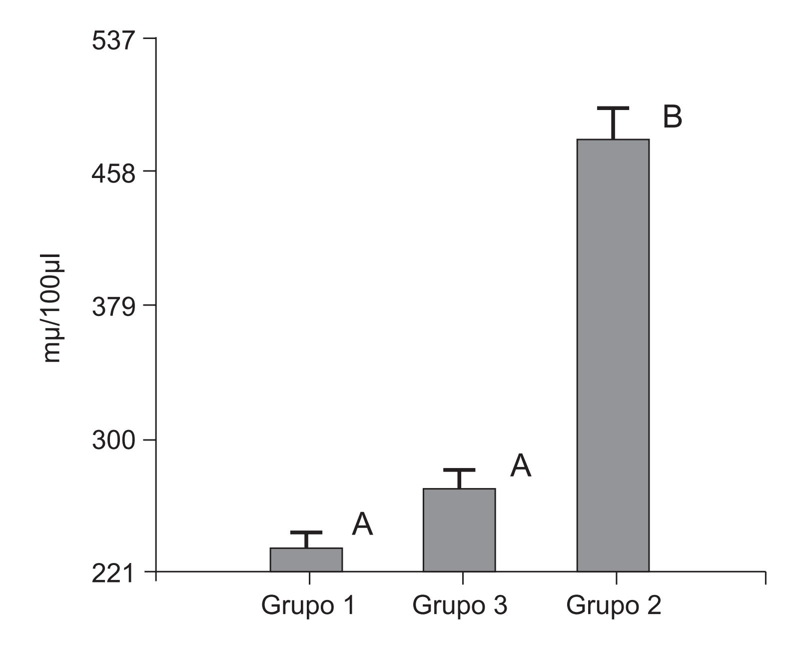


Figura 1: Actividad de lisozima en hemolinfa en tres grupos de larvas de *Spodoptera frugiperda*. Promedios ± error estándar. **Grupo 1**: sólo injuria. **Grupo 2**: Injuria + *Micrococcus luteus*. **Grupo 3**: control. A y B representan diferencias significativas ($F = 7.55$; $p < 0,01$; Test de Tukey, $p < 0,05$).

RESULTADOS

El análisis de la actividad de lisozima en la hemolinfa de las larvas de *S. frugiperda* reveló un comportamiento similar entre el grupo donde se realizó una injuria al tegumento de las larvas pero no se le suministró bacterias (1) y el grupo de larvas donde no hubo tratamientos con injuria ni con bacterias (3), no existiendo diferencias significativas entre ambos. Por otro lado, en el grupo correspondiente a las larvas tratadas con bacterias *M. luteus* (2), la actividad de la lisozima fue significativamente mayor, observándose más del triple que en los grupos anteriores (ANOVA: $F = 7{,}55$, $p < 0{,}01$; Test de Tukey $p < 0{,}05$) (Figura 1).

Los resultados de las electroforesis (SDS-PAGE) mostraron para cada grupo un perfil de proteínas diferente (Figura 2). Durante el ensayo se inhibió el entrecruzamiento de las proteínas del coágulo por la fenoloxidasa en la hemolinfa de cada uno de los tres grupos estudiados. En el perfil proteico del grupo que recibió solo injuria, se observó un mayor número de bandas que en el perfil del grupo control. Además gran parte de éstas presentó mayor intensidad, lo cual se traduce en más concentración de las mismas.

En aquel grupo que sufrió injuria y fue inoculado con *M. luteus,* se obtuvo un perfil de proteínas similar al del grupo injuriado. Sin embargo, la intensidad de las bandas fue menor, de manera general. En estos dos gru-

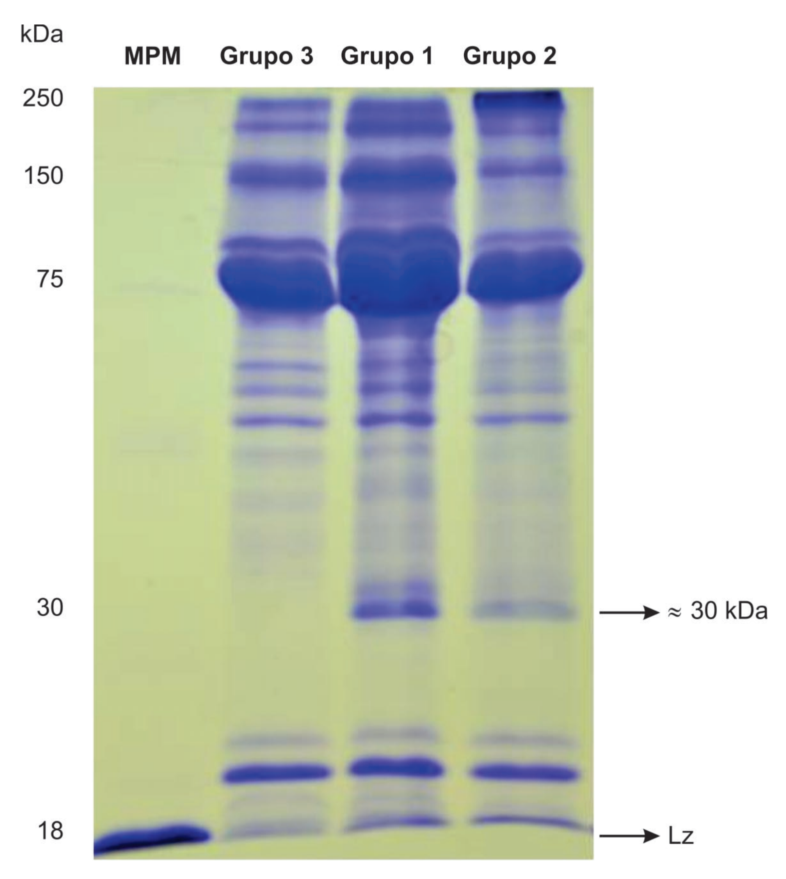


Figura 2: SDS-PAGE de hemolinfa en tres grupos de larvas de *Spodoptera frugiperda*. **MPM**: Marcador de Peso Molecular de lisozima (18 kDa). **Grupo 1**: hemolinfa de larvas solo injuriadas. **Grupo 2:** hemolinfa de larvas injuriadas y tratadas con bacterias. **Grupo 3:** Control.

pos se observó especialmente una banda proteica intensa de aproximadamente 30 kDa, la cual no aparece en el grupo control.

En cuanto a la banda de 18 kDa de peso molecular, identificada como lisozima por comparación con el patrón de lisozima pura (Sigma), se observó que si bien dicha enzima es constitutiva en la hemolinfa de *S. frugiperda* (ya que aparece como una banda tenue), en los casos en donde se produce injuria aumenta la síntesis de la misma, lo cual se observa como un aumento en la intensidad de esta banda. Cuando se produce injuria e inoculación de bacterias, la intensidad de dicha banda es semejante a la del grupo que sufrió solo injuria.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Luego de producir una infestación con bacterias, en la hemolinfa de la larva de este insecto se observa un significativo incremento en la respuesta inmune. Como consecuencia del análisis efectuado a los geles de poliacrilamida, se observa que a causa de la injuria se produce un aumento de la síntesis de lisozima, entre otras proteínas relacionadas con la respuesta inmunitaria. Sin embargo, no se observó incremento en la actividad enzimática de la misma. En los casos en donde se produjo injuria e inoculación bacteriana, la concentración de lisozima fue muy similar. No obstante se encontró que la actividad enzimática fue tres veces mayor debido a la presencia de un antígeno bacteriano.

La banda de aproximadamente 30 kDa que se observa en el SDS-PAGE y que se expresa solamente en la hemolinfa de larvas injuriadas y en larvas injuriadas e inoculadas con bacterias, podría ser uno de los polipéptidos o proteínas relacionadas con la respuesta inmune, ya sea como una proteína cuya síntesis se produce a partir del desencadenamiento de la reacción inmune o como producto de degradación de otras proteínas mayores. Sin embargo, su caracterización requiere estudios de mayor profundidad, los cuales se encuentran en curso.

En el caso de la lisozima, los resultados obtenidos son coincidentes con los encontrados en *Eisenia fetida andrei* (Lumbricidae) donde se describe que la actividad antibacteriana existe naturalmente en un nivel básico, pero aumenta la producción de ARN ante la injuria con bacterias (Hirigoyenberry *et al.*, 1990). También se observa este comportamiento de la enzima en *Manduca sexta* (Mulnix y Dunn, 1994).

Por todo lo observado se plantea el hecho de que ocurriría una nueva síntesis de proteínas involucradas en el sistema de defensa o una síntesis aumentada de las mismas, como en el caso de lisozima, pero que por otra parte recién cuando ingresa la noxa se produce el incremento de su actividad.

A pesar de que los presentes resultados implican una contribución al conocimiento de la fisiología e inmunología de insectos, muchos estudios deben ser aún realizados para obtener una completa comprensión sobre el tema.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Fundación Miguel Lillo (FML, Tucumán, Argentina). Agradecimiento especial al Lic. Pablo Pereyra por el mejoramiento de las imágenes.

LITERATURA CITADA

Adamo S. A. 2004. Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. Journal of Insect Physiology, 50: 209-216.

Bulmer M. S., Bachelet I., Raman R., Rosengaus R. B., Saslsekharan R. 2009. Targeting an antimicrobial effector function in insect immunity as a pest control strategy. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106 (31): 12652-12657.

Castro F., Rodriguez A., Juárez G., Fernández F. 2009. Aspectos comparativos de la determinación de la actividad lítica de la lisozima. Acta Zoológica Lilloana, 53: 49-56.

Chapelle M., Girard P. A. Cousserans F., Volkoff N. A., Duvic B. 2009. Lysozyme and lysozyme-like proteins from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Molecular Immunology, 47: 261-269.

Düring K., Porsh P., Mahn A., Brinkmann O., Gieffers W. 1999. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozyme. FEBS Letters, 449: 93-100.

Gandhe A. S., Janardhan G., Nagaraju J. 2007. Immune up regulation of novel antibacterial pro- teins

from silkmoths (Lepidoptera) that resemble lysozyme but lack muramidase activity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37: 655- 666.

Gillespie J. P., Kanost M. R., Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annual Review of Entomology, 42:611-643.

Harris E. L. V., Angal S. 1989. Protein purification methods: A practical approach. IRL Press, Oxford University Press, England, 327 pp.

Hirigoyenberry F., Lasssalle F. M., Lassegues. 1990. Antibacterial activity of *Eisenia fetida andrei* coelomic fluid: Transcription and translation regulation of lysozyme and proteins evidenced after bacterial infestation. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 95 (1): 71-75.

Ibrahim H. R., Matsuzaki T., Aoki T. 2001. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. FEBS Letters, 506: 27-32.

Narayanan, K. 2004. Insect defense: its impact on microbial control of insect pests. Current Science, 86 (6): 800-814.

Markart P., Faust N., Graf T., Weaver T. E., Akinbi H. 2004. Comparison of the microbicidal and muramidase activities of lysozyme M and P. Bio- Chemical Journal, 380: 385-392.

Medina Pereyra M. P., Castro F., Fernández F. 2012. Actividad de lisozima en hemolinfa de larvas y pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Acta Zoológica Lilloana, 56 (1-2): 31-37.

Mulnix A. B., Dunn P. E. 1994. Structure and induction of a lysozyme gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochemistry Molecular Biology, 24(3): 271-81.

Osores V., Willink E., Costilla M. 1982. Cría de *Diatraea saccharalis* F. en laboratorio. Boletín de la EEAOC, Tucumán, 139: 1-10.

Rao X. J., Ling, E., Yu, X. Q. 2010. The role of lysozyme in the prophenoloxidase activation system of *Manduca sexta*: An *in vitro* approach. Developmental and Comparative Immunology, 34: 264-271.

Scherfer C., Karlsson C., Loseva O., Bidla G., Goto A., Havermann J., Dushay M., Theopold U. 2004. Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by pullout method. Current Biology, 14: 625-629.

Silva J. L. C., Barbosa J. F., Bravo J. P., de Souza E. M., Huergo L. F., Pedrosa F. O., Esteves E., Daffre S., Fernández M. A. 2010. Induction of a gloverin-like antimicrobial polypeptide in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* challenged by septic injury. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 43: 431-436.

Willink E., Osores V. M., Costilla M. A. 1991. El gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797). En: Actas del II Congreso Argentino de Entomología, La Cumbre, Córdoba, 1991, pp. 262.